



**University of
Zurich**^{UZH}

**Zurich Open Repository and
Archive**

University of Zurich
University Library
Strickhofstrasse 39
CH-8057 Zurich
www.zora.uzh.ch

Year: 2018

Tierschutzrechtliche Einordnung induzierbarer Transgen- und Knockout-Systeme

Buch, Thorsten ; Davidson, Jutta ; Iglauder, Franz ; Röllicke, Thomas ; Schenkel, Johannes

Posted at the Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich

ZORA URL: <https://doi.org/10.5167/uzh-156801>

Published Research Report

Published Version

Originally published at:

Buch, Thorsten; Davidson, Jutta; Iglauder, Franz; Röllicke, Thomas; Schenkel, Johannes (2018). Tier-
schutzrechtliche Einordnung induzierbarer Transgen- und Knockout-Systeme. Max-Planck-Institut für
Immunbiologie und Epigenetik: GV-SOLAS.

Fachinformation

**aus dem Ausschuss für Genetik und
Labortierzucht**

Tierschutzrechtliche Einordnung induzierbarer Transgen- und Knockout- Systeme

Stand: 3. September 2018

Autoren:

**Thorsten Buch, Zürich
Jutta Davidson, Sulzfeld
Franz Iglauer, Tübingen
Thomas Rülcke, Wien
Johannes Schenkel, Heidelberg**

1 Schlüsselwörter (Keywords):.....	- 2 -
2 Haftungsausschluss	- 2 -
3 Generelle tierschutzrechtliche Betrachtungen.....	- 3 -
3a Tierschutzrechtliche Betrachtungen für Deutschland	- 3 -
3b Tierschutzrechtliche Betrachtung für die Schweiz	- 4 -
3c Tierschutzrechtliche Betrachtung für Österreich	- 4 -
4 Induzierbare Transgene	- 5 -
5 Induzierbare konditionale Mutation endogener Loci.....	- 7 -
6 Virale und weitere Genexpressionssysteme	- 7 -
7 Induzierbare Aktivität der Produkte der Transgene.....	- 7 -
8 Tierschutzrechtliche Einordnung induzierbarer Transgen- und Knockout- sowie weiterer Rekombinationssysteme	- 8 -
8a Induzierbare Transgene und die deutschen Tierschutzregelungen.....	- 8 -
8b Induzierbare Transgene und die Schweizer Tierschutzregelungen.....	- 11 -
8c Induzierbare Transgene und die österreichischen Tierschutzregelungen	- 11 -
9 Literatur	14

1 Schlüsselwörter (Keywords):

Transgen, Induktion, konditional, Belastung, Recht, Deutschland, Schweiz, Österreich

2 Haftungsausschluss

Die Benutzung der Hefte (Veröffentlichungen) und Stellungnahmen der GV SOLAS und die Umsetzung der darin enthaltenen Informationen erfolgt ausdrücklich auf eigenes Risiko. Die GV-SOLAS und auch die Autoren können für etwaige Unfälle und Schäden jeder Art, die sich durch die Nutzung der Veröffentlichung ergeben (z.B. aufgrund fehlender Sicherheitshinweise), aus keinem Rechtsgrund eine Haftung übernehmen. Haftungsansprüche gegen die GV SOLAS und die Autoren für Schäden materieller oder ideeller Art, die durch die Nutzung oder Nichtnutzung der Informationen bzw. durch die Nutzung fehlerhafter und/oder unvollständiger Informationen verursacht wurden, sind grundsätzlich ausgeschlossen. Rechts- und Schadenersatzansprüche sind daher ausgeschlossen. Das Werk inklusive aller Inhalte wurde unter größter Sorgfalt erarbeitet. Die GV SOLAS und die Autoren übernehmen jedoch keine Gewähr für die Aktualität, Korrektheit, Vollständigkeit und Qualität der bereitgestellten Informationen. Druckfehler und Falschinformationen können nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die GV SOLAS und die Autoren übernehmen keine Haftung für die Aktualität, Richtigkeit und Vollständigkeit der Inhalte des Buches, ebenso nicht für Druckfehler. Es kann keine juristische Verantwortung sowie Haftung in irgendeiner Form für fehlerhafte Angaben und daraus entstandenen Folgen von der GV SOLAS und den Autoren übernommen werden. Für die Inhalte von den in diesen Veröffentlichungen abgedruckten Internetseiten sind ausschließlich die Betreiber der jeweiligen Internetseiten verantwortlich. Die GV SOLAS und die Autoren haben keinen Einfluss auf Gestaltung und Inhalte fremder Internetseiten. Die GV SOLAS und die Autoren distanzieren sich daher von allen fremden Inhalten. V.i.S.d.P. der Vorstand der GV SOLAS.

Induzierbare Transgen- und Knockout-Systeme in Labornagern erfahren eine immer größere Verbreitung in der biomedizinischen Forschung. Aufgrund des konditionalen Charakters des Phänotyps stellen diese Systeme Wissenschaftler und Behörden bezüglich der tierschutzrechtlichen Einordnung der Haltung oder Zuchten solcher Tiermodelle vor große Herausforderungen. Im Folgenden beschreiben wir die rechtlichen Grundlagen in Deutschland, Österreich und der Schweiz wie auch die verschiedenen transgenen Systeme und nehmen eine Einordnung vor.

3 Generelle tierschutzrechtliche Betrachtungen

3a Tierschutzrechtliche Betrachtungen für Deutschland

Tierversuche sind Eingriffe oder Behandlungen an Tieren zu Versuchszwecken, wenn sie mit Schmerzen, Leiden oder Schäden für die Tiere verbunden sein können¹. Aber auch „Eingriffe“ am Erbgut von Tieren, wenn sie mit Schmerzen, Leiden oder Schäden für die erbgutveränderten Tiere verbunden sein können², werden als Tierversuche bezeichnet. Ebenso gelten als Tierversuche Eingriffe und Behandlungen, die nicht direkt Versuchszwecken dienen sondern die u. a. zur Vermehrung von Organismen vorgenommen werden³. Als „Tierversuch“ im Sinne des Tierschutzgesetzes (TierSchG) muss auch das Verpaaren von Tieren angesehen werden, wenn dies mit dem Ziel erfolgt, Nachkommen zu züchten ("geboren werden oder schlüpfen"⁴), welche genetische Veränderungen tragen, die Schmerzen, Leiden oder Schäden verursachen können. Sodann ist auch diese Zucht als Tierversuch im Sinne § 7(2) TierSchG zu sehen. Ein solcher „Tierversuch“ durch reine Zucht von genetisch veränderten Tieren gilt erst als abgeschlossen, wenn an den genetisch veränderten Nachkommen keine weiteren Beobachtungen mehr anzustellen sind und auch nicht zu erwarten ist, dass die Nachkommenschaft aufgrund dieser genetischen Veränderungen, Schmerzen oder Leiden empfinden oder dauerhafte Schäden erleiden⁵. Das Versuchsergebnis bei der Generierung oder Züchtung einer neuen genetisch veränderten Tierlinie ist nicht zuverlässig prognostizierbar, selbst in solchen Fällen, in denen der Einfluss der Erbgutveränderung hinsichtlich des zu erwartenden Phänotyps mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit abgeschätzt werden kann. Hier liegt also ein „Versuchszweck“ im Sinne des § 7 (2) Satz 1, nicht aber im Sinne des Satzes 2 des TierSchG vor. Daher ist die Generierung einer neuen genetisch veränderten Tierlinie stets gemäß §8 TierSchG als Tierversuch mit Versuchszweck zu behandeln

Etablierte unbelastete Mutanten in der Gesetzgebung

Bei etablierten Mutanten ist das Resultat der genetischen Veränderung bezüglich des Phänotyps bekannt und es ist abschätzbar, ob solche Mutanten hierdurch genetisch bedingte Schmerzen, Leiden oder Schäden zu ertragen haben, bzw. unter welchen (Umwelt-) Bedingungen gegebenenfalls solche auftreten. Sind bei Tieren mit genetischen Veränderungen jedoch Schmerzen, Leiden oder Schäden auszuschließen, nachdem sich dies durch sorgfältige Beobachtungen unter Zuhilfenahme geeigneter Bewertungsbögen⁶ herausgestellt hat und in einer Abschlussbeurteilung dokumentiert wurde, unterliegt die Weiterzucht weder einer Genehmigungs- noch einer Anzeigepflicht.

Einordnung belasteter Mutanten

Ist hingegen bei den Nachkommen eine genetisch bedingte Belastung (Schmerzen, Leiden, Schäden) nicht auszuschließen, zu erwarten oder nachgewiesen, so unterliegt die Weiterzucht der Genehmigungspflicht, bzw. soweit ein Fall des §8a Abs. 1 TierSchG vorliegt, wie z.B. rechtlich vorgeschriebene Tests oder kein Versuchszweck im Sinne des §7 Abs. 2

¹ § 7 (2) Satz 1 Nr. 1 TierSchG

² § 7 Abs.2 Satz 1, Nr. 3 TierSchG

³ § 7 Abs. 2, Satz 2, Nr. 1 TierSchG

⁴ § 7 Abs. 2, Satz 1, Nr. 2 TierSchG

⁵ § 7a Abs. 5 Nr. 2 Tierschutzgesetz

⁶ Anlage 1, 2, 3, 4 zu „Dokumentation und Veröffentlichung der Belastungseinstufung für genetisch veränderte Versuchstiere“ im Juni 2013 vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

Satz 2 TierSchG vorliegt, der Anzeigepflicht. Bei vorliegenden oder zu erwartenden schweren Belastungen der Nachkommen ist aber auch in solchen Fällen eine Genehmigung zu beantragen⁷.

3b Tierschutzrechtliche Betrachtung für die Schweiz

In der Schweiz können gentechnisch veränderte Tiere nach vereinfachter Bewilligung (Antragsformular Form-G) für die Tierhaltung mittels anerkannter Methoden wie z.B. Zucht, Pronukleus-, und Blastozysteninjektion erzeugt werden⁸. Diese anerkannten Methoden müssen möglichst tierschonend und standardisiert durchgeführt werden⁹. Dies beinhaltet eine Erfolgsdokumentation⁸. Neue Methoden können gegebenenfalls anerkannt werden¹⁰. Die Belastungserfassung von neu erstellten transgenen Tieren ist im schweizerischen Tierschutzgesetz (TSchG), in der Tierschutzverordnung (TSchV) sowie in der Verordnung des Bundesamts für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen (BLV) über die Haltung von Versuchstieren und die Erzeugung gentechnisch veränderter Tiere sowie über die Verfahren bei Tierversuchen (Tierversuchsverordnung, TVV) geregelt. Es ist eindeutig vorgegeben, dass bei allen neu erstellten Stämmen sowie bei nicht ausreichend charakterisierten Linien, unabhängig der phänotypischen Erwartungen, eine Belastungserfassung über mindestens drei Generationen und 100 Tiere durchgeführt werden muss¹¹, bevor sie als unbelastet gelten können. Die Kontrollen umfassen Nestkontrollen und Kontrollen während des Umsetzens¹². Zwischen diesen Kontrollen müssen die Tiere einmal wöchentlich beobachtet werden, welches mit der dreimal wöchentlich zu erfolgenden visuellen Kontrolle aller Tiere¹³ kombiniert werden kann. Neugeborene müssen innerhalb von fünf Tagen das erste Mal kontrolliert werden. Die Parameter dieser Belastungskontrollen sind genau festgelegt¹⁴. Im Rahmen dieser Belastungserfassungen müssen Daten über Reproduktionserfolg und Mortalität erfasst und mit nicht-transgenen Tieren desselben Hintergrundstammes verglichen werden. Wird eine ähnliche Belastung in mehreren Tieren einer Linie festgestellt, muss diese innerhalb von zwei Wochen an die zuständige Behörde nach den Vorgaben von Art. 14 TVV¹⁵ provisorisch via des Antragsformulars Form-M gemeldet sowie geplante belastungsmindernde Maßnahmen mitgeteilt werden. Eine definitive Meldung erfolgt entweder, wenn die Belastung nachgewiesen ist, oder aber spätestens nach 100 Tieren und drei Generationen¹⁶. Auch die Nichtbestätigung eines provisorisch gemeldeten Belastungsphänotyps muss gemeldet werden. Die Zucht belasteter Linien ist nur im Umfang für geplante Experimente möglich und bedarf bei höherer Belastung einer Güterabwägung sowie belastungsmindernder Maßnahmen¹⁷. Die Zulassung der weiteren Zucht und begleitender Maßnahmen wird durch die kantonalen Behörden entschieden¹⁸.

3c Tierschutzrechtliche Betrachtung für Österreich

Gemäß § 2 Z 1 lit. c) des österreichischen Tierversuchsgesetzes (TVG 2012) ist jede Verwendung von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken, die dazu führen soll oder kann, dass eine genetisch veränderte Tierlinie in einem Zustand geschaffen und erhalten wird, der Schmerzen, Leiden, Ängste oder dauerhafte Schäden verursachen kann, ein Tierversuch. Daher stellt die Herstellung genetisch veränderter Tiere, unabhängig von der verwendeten Methode bzw. Strategie, einen Tierversuch dar und bedarf einer Genehmigung durch die

⁷ TierSchG §8a Abs 2 Nr.2

⁸ TSchG Art. 11, TVV Art. 142, TVV Anhang 1

⁹ TVV Art. 9 Absatz 3 und 4

¹⁰ TVV Art. 9 Absatz 2

¹¹ TVV Art. 124, TVV Art. 14 Absatz 3 und 4

¹² TVV Art. 14 Abs. 2 und 15 Abs. 2, Art. 14 Abs. 1 und 15 Abs. 2

¹³ TVV Art. 2 Abs. 3

¹⁴ TVV Anhang 4

¹⁵ TVV, Art. 126 und 145 Abs. 1 Bst. a TSchV

¹⁶ Art. 126 und 145 Abs. 1 Bst. a TSchV, TVV Art. 18

¹⁷ TSchV Art.125, TVV Art. 18d und e

¹⁸ TSchV Art. 127

zuständige Behörde. Gleiches gilt für die Zucht und Haltung genetisch veränderter Tierlinien: Da die phänotypische Auswirkung einer Mutation, unabhängig davon, ob diese konstitutiv oder konditional ist, nicht sicher vorausgesagt werden kann und mögliche Belastungen der Tiere nicht auszuschließen sind, ist die Zucht und Haltung jeder neuen Linie genehmigungspflichtig. Projekte, in deren Rahmen die Linie verwendet wird, müssen die phänotypische Beurteilung der Linie hinsichtlich des Schweregrades einschließen. Die Genehmigungspflicht entfällt, sobald die Linie etabliert und das Vorliegen eines unbelasteten Phänotyps durch eine entsprechende Dokumentation nachgewiesen ist. Zu den Kriterien für die Beurteilung des Phänotyps wird auf den Annex des „Working document on genetically altered animals“ verwiesen¹⁹. Zu berücksichtigen ist, dass die Zucht und Haltung unbelasteter, genetisch veränderter Tiere in allen anderen Belangen (Haltungsbedingungen, etc.) weiterhin den tierversuchsrechtlichen Vorschriften (TVG 2012, Tierversuchs-Verordnung, TVV 2012) unterliegen.

Für neue Linien, zu denen auch durch Zucht geschaffene Mehrfachmutanten zählen, ist dem Antrag eine detaillierte Beurteilung des zu erwartenden Phänotyps beizulegen, auf deren Grundlage die Einschätzung des Schweregrades erfolgt. Für bereits etablierte Linien werden Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung aus wissenschaftlichen Publikationen anerkannt. Unzureichend charakterisierte Linien werden wie neu geschaffene behandelt.

Für die Genehmigung von Tierversuchen und somit auch für die Herstellung genetisch veränderter Tiere sowie für die Zucht und Haltung belasteter Linien, ist in Österreich eine Projektbeurteilung gemäß § 29 Abs. 2 TVG 2012, einschließlich einer Schaden-Nutzen-Analyse, durchzuführen.

4 Induzierbare Transgene

Transgene Labornager spielen in der biomedizinischen Forschung eine herausragende Rolle. In diesen Tieren werden syngene oder xenogene Transgene ausgeprägt. Für spezifische Fragestellungen werden genetisch modifizierte Tiermodelle genutzt, bei denen experimentell Einfluss auf den Zeitpunkt und das Gewebe für die Transgenexpression oder für die Aktivität des Genproduktes genommen werden kann. Prinzipiell können drei Strategien zur Regulation der Transgenexpression unterschieden werden: (i) Die Transaktivierung der Transkription über regulierbare Transkriptionsfaktoren, (ii) die sequenzspezifische DNA-Rekombination, die eine genomische Modifikationen beinhaltet und (iii) die post-translationale Kontrolle der Funktion eines Genproduktes. Einige häufig angewandte Methoden werden nachfolgend kurz dargestellt.

Die direkte Expressionskontrolle erfolgt entweder durch die Aktivierung von Promotoren mit Hilfe endogener Transkriptionsfaktoren oder es wird ein artifiziell aktivierbares Expressionssystem verwendet, für das Transkriptionsfaktoren ebenfalls transgen eingebracht werden. Beispiele für Promotoren, die durch endogene Transkriptionsfaktoren mittels eines Signals reguliert werden können, sind der MX-Promoter durch Typ 1 Interferon (Kühn et al. 1995) oder poly(I)/poly(C), der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) (McGrane et al. 1988) durch den Protein- und Kohlenhydratgehalt der Nahrung und der HSP70 Promoter durch Hitze (Smith et al. 2002). Weitere Systeme basieren auf der transgenen Expression von regulierbaren Transkriptionsfaktoren. Das vermutlich am häufigsten genutzte System ist das Tet-Off- bzw. das Tet-On-System. In diesem System wird die Regulierbarkeit des Zieltransgens durch die transgene Expression des Tetrazyklin-abhängigen Transaktivators tTA (Tet-Off-System) (Gossen and Bujard 1992) oder des reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivators rtTA (Tet-On-System) (Gossen et al. 1995) erreicht (Abb. 1A und B). Diese Transaktivatoren können unter einen gewebe- oder zellspezifischen Promoter gestellt werden. Beim Tet-Off-System wird das Zieltransgen, welches das TRE (Tetracycline response element)-Promoterelement trägt, durch Entzug des Tetrazyklins, meist Doxycyclin, angeschaltet. Im Fall des Tet-On-Systems geschieht dies durch Gabe von Doxycyclin. Ein weiteres System ist das LightOn-Modell (Wang et al. 2012) bei dem Genexpression durch Exposition mit blauem Licht induziert wird (Abb. 1C). Hierzu

¹⁹ http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/corrigendum.pdf

wird der Transkriptionsfaktor GVAP ausgeprägt, welcher unter Licht dimerisiert und an den künstlichen Zielpromoter bindet (Wang et al. 2012).

Genexpression kann aber auch durch Rekombinasen wie Cre, Dre oder FLP und ihren Zielsequenzen loxP, rox, und FRT reguliert werden (Golic and Lindquist 1989; Sauer and Henderson 1989; Anastassiadis et al. 2009). Häufig wird eine Stopp-Kassette, welche transkriptionelle und translationale Abbruchmechanismen beinhaltet, mit loxP Sequenzen flankiert und zwischen Promoter und offenen Leserahmen gesetzt. Rekombination beseitigt die Kassette und Expression kann erfolgen (Abb. 1D). Eine andere Möglichkeit der Transgen-Aktivierung besteht darin, ein mit gegenläufigen loxP-Sequenzen flankiertes DNA-Segment durch Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination in transkriptionelle Orientierung zu bringen (Abb. 1E).

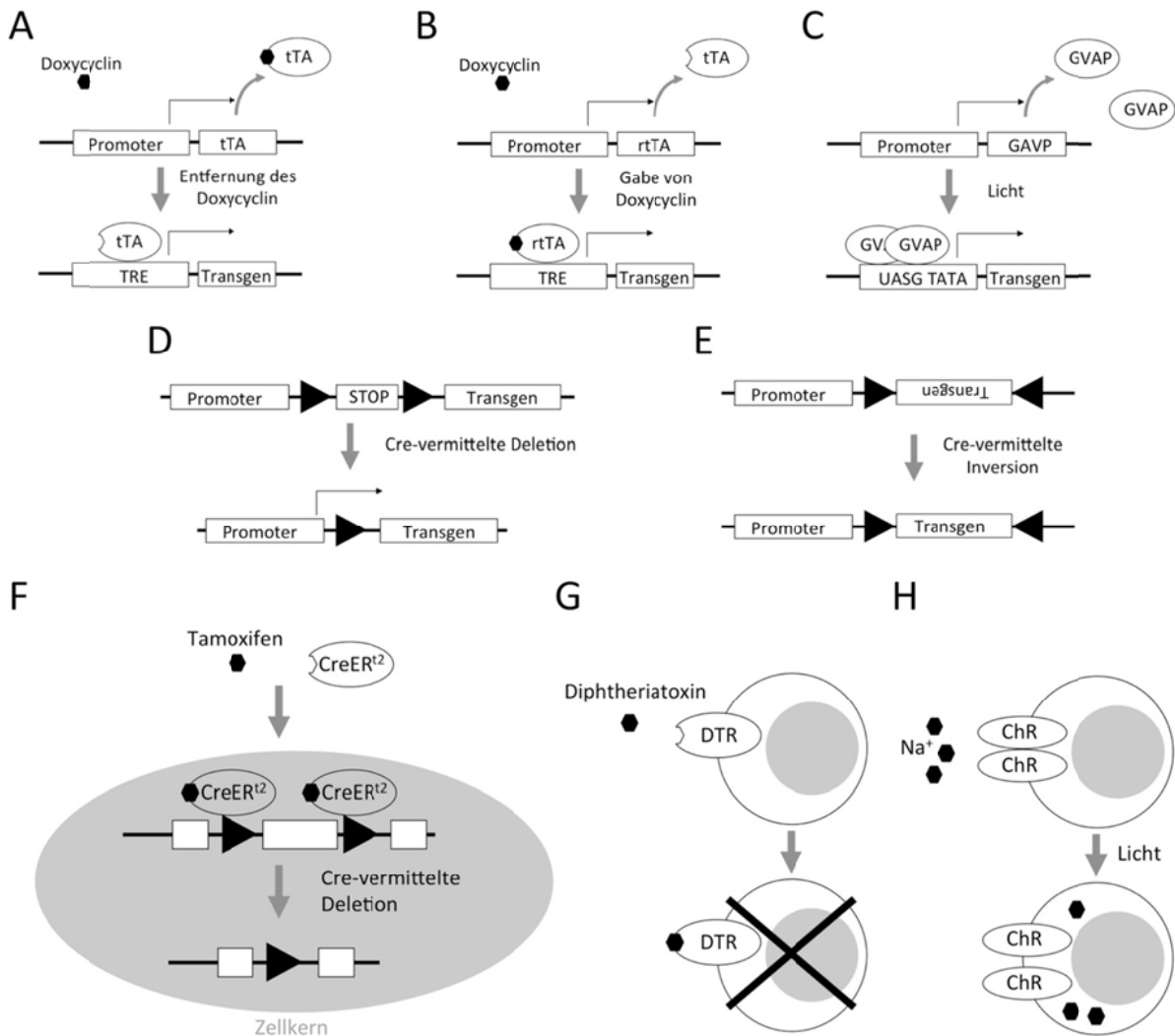


Abbildung 1: Beim Tet-Off-System (A) wird der TRE- (Tetracycline response element) Promoter des zu regulierenden Transgens durch den Entzug von Doxycyclin aktiviert. Beim Tet-On-System (B) wird der TRE-Promoter durch die Zugabe von Doxycyclin eingeschaltet. (C) Dimerisierung von GVAP durch Bestrahlung führt zu Aktivierung des UASG Promotorelementes. (D) Cre-vermittelte Entfernung einer Stopp-Kassette kann zur kontrollierten Einschaltung eines Gens verwendet werden. (E) Cre-vermittelte Inversion kann Transgene an- und ausschalten, wie durch die Orientierung des Wortes „Transgen“ angedeutet. (F) CreER^{T2} kann erst nach Bindung von Tamoxifen in den Zellkern eindringen und dort Rekombination auslösen. (G) Transgene Expression eines Diphtherietoxin-Rezeptors (DTR) erlaubt Zellablation durch die Gabe von Diphtherietoxin. (H) Channelrhodopsin (CHR) ist ein Licht-kontrollierter Kationenkanal.

5 Induzierbare konditionale Mutation endogener Loci

Konditionale Knockout-Systeme haben in den letzten Jahren große Verbreitung gefunden, da sie es erlauben, ein Zielgen in einem bestimmten Zelltyp, Gewebe oder Organ des Organismus bzw. zu einem definierten Zeitpunkt zu inaktivieren. Mit diesen Ansätzen lässt sich die Funktion eines Gens genauer bestimmen als dies durch konstitutive Knockouts möglich ist. Konditionalen Knockouts ist gemeinsam, dass sequenzspezifische Rekombinase-Systeme verwendet werden, um das Zielgen zu inaktivieren. Am häufigsten wird die Cre-Rekombinase, gefolgt von Dre-Rekombinase und FLP-Rekombinase, mit den entsprechenden Zielsequenzen loxP, rox und FRT, genutzt. Das Zielgen oder essenzielle Teile desselben werden durch Gene-Targeting z.B. mit loxP Sequenzen flankiert („gefloxt“). Als zweiter Teil des Systems fungiert die transgene Expression der Cre-Rekombinase. Zusammengekreuzt führt dies bei gleicher Orientierung der loxP-Sequenzen zu einem Herausschneiden der gefloxten Zielregion (Abb. 1D). Analog werden die anderen Rekombinationssysteme verwendet. Um ein Gen zu einem bestimmten Zeitpunkt zu inaktivieren, wird heute in der Regel das Fusionsprotein von Cre mit einer mutierten Ligandenbindungsdomäne des humanen Östrogenrezeptors (CreER^{T2}) (Feil et al. 1996; Indra et al. 1999) verwendet. CreER^{T2} liegt gewöhnlich, an Heatshock-Protein (HSP) gebunden, im Zytoplasma vor und transloziert nach Tamoxifen-induzierter Ablösung von HSP in den Nukleus. Dort findet dann die Rekombination am Zielgen statt (Abb. 1F). Eine weitere Variante der induzierbaren Cre-Aktivität kann durch das Tet-On-System erreicht werden, indem die Expression der Cre-Rekombinase unter Regie des TRE Elements gestellt wird (Saam and Gordon 1999).

Eine Kombination der Systeme stellt die Induktion der Expression von mutierten Exonen dar. Hierbei wird ein Exon oder eine Genregion mit loxP Sequenzen flankiert und dieselbe Region, allerdings z.B. punktmutiert, hinter der loxP-flankierten Region eingebracht. Nun kann im endogenen Locus durch Cre-Aktivität von der Expression des Wildtyp-Proteins auf das mutierte Protein umgestellt werden (Kraus et al. 2001).

6 Virale und weitere Genexpressionssysteme

Die Einbringung von DNA oder RNA in somatische Zellen durch Viren, chemische oder physikalische Methoden stellt im weitesten Sinne auch eine Form der induzierten transgenen Genexpression dar. Retro- und lentivirale Expression wird häufig für die Modifikation von Zellen des hämatopoetischen Systems verwendet und ist durch Integration in das Genom der Zielzellen stabil. So kann durch Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen nach Generierung von Knochenmarksschimplen das gesamte Immunsystem von modifizierten Zellen aufgebaut sein (Szymczak et al. 2004). Für die Leber kann Adenovirus verwendet werden, wenn auch mit in der Regel nur transienter Expression. In den Neurowissenschaften werden häufig adenoassoziiertes Virus (AAV) (Smith et al. 1995) und Rhabdovirus verwendet (Wickersham et al. 2007), um Transgene in Zellen bestimmter Regionen des Nervensystems einzubringen. Eine physikalische Methode der Einbringung eines Transgens stellt die hydrodynamische Transfektion von Leberzellen mit einem Plasmid dar (Liu et al. 1999). Auch die DNA-Vakzinierung durch intramuskuläre Injektion gehört zu diesen Systemen. Beide führen in der Regel zu transienter Expression. Lipofektion ist eine Form der chemischen Einbringung von Transgenen und kann in Kombination mit Kavitation (Bildung und Auflösung von Blasen in Flüssigkeiten) erfolgreich in vivo eingesetzt werden.

7 Induzierbare Aktivität der Produkte der Transgene

Bei dieser Art von Systemen wird der Effekt des Transgens nicht durch Expressionskontrolle sondern durch induzierende chemische oder physikalische Faktoren erbracht. Da einige dieser Systeme auch für die Transkriptionskontrolle einsetzbar sind, besteht eine gewisse Überlappung mit schon beschriebenen Systemen. Die Liste solcher Modelle ist lang und sehr spezifisch für jeweilige Forschungsfelder.

Zellablationssysteme erlauben das Töten bestimmter Zellen zu einem definierten Zeitpunkt. Hierzu gehören das Herpes simplex Thymidinkinase-System, welches durch Gabe von Ganciclovir zum Tod sich teilender Zellen führt (Bush et al. 1998), sowie das Diphtherietoxin

Rezeptorsystem (Abb. 1G), bei dem durch Injektion des Diphtherietoxins die mit dem Rezeptor transgen markierten Zellen getötet werden (Saito et al. 2001). Eine Kombination von Rekombination mit Zellablation kommt bei transkriptioneller Diphtherietoxin A Aktivierung zum Tragen (Ivanova et al. 2005; Brockschneider et al. 2006). Hier wird häufig eine Stopp-Kassette durch Cre-vermittelte Rekombination nach Tamoxifen-Gabe entfernt. Im Rahmen optogenetischer Systeme kann die Aktivität von Nervenzellen durch Licht-Exposition reguliert werden. Hier sind das Channelrhodopsin (Boyden et al. 2005) und Halorhodopsin (Han and Boyden 2007) zu nennen, welche als Kationen- beziehungsweise Chloridkanal fungieren.

8 Tierschutzrechtliche Einordnung induzierbarer Transgen- und Knockout-sowie weiterer Rekombinationssysteme

8a Induzierbare Transgene und die deutschen Tierschutzregelungen

Das damalige deutsche Bundesministerium für Forschung hatte schon 1996 ein Informationspapier über die tierschutzrechtliche Einordnung der Herstellung gentechnisch veränderter Tiere erstellt. Seine Kernaussagen (Cramer et al. 1996), die im Großen und Ganzen auch heute noch zutreffen, sind:

a) Die Erzeugung von transgenen oder Knockout-Tier-Stämmen stellt nach deutschem TierSchG einen Tierversuch dar und unterliegt, soweit es sich um Wirbeltiere oder (seit 2013) um Kopffüßer handelt, der Genehmigungspflicht.

b) Die Weiterzucht solcher gentechnisch veränderten Tiere über die zweite Nachkommengeneration hinaus war bis zur Novellierung des TierSchG 2013 weder anzeige- noch genehmigungspflichtig, sondern stellte eine bloße Zuchtmaßnahme nach §11 TierSchG dar. Auch die Weiterzucht von Tieren, die Träger von Erbgutveränderungen mit gesundheitsschädlichen Auswirkungen sind, war und ist weiterhin erlaubt, sofern dies wissenschaftlichen Zwecken dient²⁰. Die Tierzüchter sind nach wie vor verpflichtet, alle Maßnahmen zu ergreifen, um das Wohlergehen der Tiere unter den für sie erforderlichen Haltungsbedingungen zu gewährleisten. Voraussetzung für die Wahrnehmung dieser Fürsorgepflicht sind adäquate Fachkenntnisse aller in die Betreuung des Tierbestandes involvierten Personen²¹, insbesondere über die Art und Funktion spezifischer Mutationen der Tiere. Die Fürsorgepflicht impliziert darüber hinaus eine adäquate tierärztliche Überwachung des Tierbestandes und gegebenenfalls notwendige Behandlungen mit adäquater Dokumentation der durchgeführten Maßnahmen. Durch die von der Europäischen Union 2010 verlangte Änderung des Tierschutzrechts²² ist es notwendig, auch die Weiterzucht von genetisch veränderten Tieren gegenüber den zuständigen Behörden anzuzeigen oder eine Genehmigung zu beantragen, solange an der Nachkommenschaft Beobachtungen / Untersuchungen zu ihrer Charakterisierung angestellt werden oder bei diesen Schmerzen, Leiden oder Schäden aufgrund der genetischen Veränderung zu erwarten sind.

Abgesehen von diesen Betrachtungen gilt natürlich, dass, wenn an gentechnisch veränderten Tieren Versuche durchgeführt werden, die zu Schmerzen, Leiden oder Schäden führen können, diese auch nach wie vor in Abhängigkeit von Versuchszweck und Belastung der Anzeige- oder Genehmigungspflicht unterliegen.

Die aufgeführten Kernpunkte des Informationspapiers des ehemaligen deutschen Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz gelten selbstverständlich auch für induzierbare transgene oder Knockout Tiere. Die tierschutzrechtliche Bewertung der Induktionsmaßnahmen erfolgt in Abhängigkeit von folgenden Faktoren:

A) Zweck der Induktion: Die Induktion des Systems kann zu einem Versuchszweck erfolgen. Sie kann aber auch eine tierärztliche Behandlung von Zuchten darstellen oder zum Zweck

²⁰ § 11b Abs.3 TierSchG

²¹ § 3, Abs.1, Nr. 1 und §11 Abs.1, Nr.1 u. 2 TierSchVersV, Wilson et al., 1995; Nevalainen et al., 2000; Nevalainen et al., 1999

²² EU-Directive 2010/63EU, Novellierung des TierSchG und TierSchVersV

des Stamm-Erhalts gehaltener Tiere im Rahmen der Fürsorgepflicht des Verantwortlichen nach § 11 TierSchG erfolgen. So ist beispielsweise das Tet-Off-System ohne jede Intervention aktiv, es kann aber durch die Zugabe von Doxycyclin als Induktor gehindert werden, sich zu aktivieren oder auch ausgeschaltet werden (siehe Abb.1). Beim Tet-Off-System kann somit eine Doxycyclin-Applikation genutzt werden, um die Expression eines gesundheitsschädlichen Genprodukts bei Zucht- und Vorrattieren zu unterbinden. In diesem Fall ist die Doxycyclin-Applikation verpflichtend und einer Genehmigung bzw. Anzeige bedarf es nur, wenn dadurch die gesundheitsschädliche Wirkung des Genproduktes nicht vollständig verhindert werden kann oder das Doxycyclin bzw. durch deren Applikation selbst (Injektionen oder Ähnliches) bei den Tieren Schmerzen, Schäden oder Leiden ausgelöst werden.

Es gibt allerdings Interpretationsansätze, welche solche Maßnahmen als „Refinement“ ansehen, weil sie zwar ein Risiko der Belastung minimieren aber nicht vollständig eliminieren würden. Dies wird mit Verweis auf die EU-Direktive²³ als Grund angesehen, solche Gaben, also z.B. von Doxycyclin im Tet-Off-System, immer als Tierversuch einzuordnen. Konkret wird aber in der Direktive²³ ausgeführt, dass das „Ausschalten von Schmerzen, Ängsten Leiden oder dauerhaften Schäden durch die erfolgreiche Anwendung von Betäubungsmitteln, Schmerzmitteln oder anderen Methoden“ keinen Grund darstellt, die betroffenen Tiere nicht unter die Zuständigkeit der Direktive einzuordnen, also sie nicht als Tiere im Tierversuch zu betrachten. Es kann allerdings nur etwas ausgeschaltet werden, was zuvor existent bzw. angeschaltet war. Gemeint ist also die Situation, in der bereits eine Noxe als potentielle Ursache für Schmerzen, Ängste, Leiden oder dauerhafte Schäden vorliegt und die daraus resultierende Belastung durch adäquate Maßnahmen abgeschaltet wird. Bei fachgerechter Doxycyclin-Applikation (Induktion) an Mutanten mit dem Tet-Off-System ist die Expression eines gesundheitsschädlichen Genprodukts mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit solange unterbunden, bis die Behandlung abgesetzt wird. Die Berücksichtigung der Möglichkeit eines „Restrisikos“ für das Auftreten einer Beeinträchtigung, wird in der EU-Direktive nicht angesprochen, sodass davon auszugehen ist, dass sich diese Norm nur auf konkrete und tatsächlich beim Tier bereits wirksame Noxen bezieht, nicht aber auf die hypothetische Möglichkeit, dass durch besondere Umstände eine Beeinträchtigung eintreten könnte.

B) Beeinträchtigung der Tiere durch die Induktion per se: Es ist zu klären, ob die Induktion, also die Gabe von z.B. Doxycyclin (Tet-On) oder Tamoxifen (CreER^{T2}) per se Schmerzen, Leiden oder Schäden hervorruft. Wenn die Applikation der Induktoren auf parenteralem Weg erfolgt, muss in der Regel von einer Belastung durch die Induktion selbst (Injektionsschmerz) ausgegangen werden. Aber auch die Gabe von Induktoren über das Futter oder über das Trinkwasser kann als belastend eingestuft werden, wenn dadurch die Nahrungsaufnahme temporär oder auf Dauer beeinträchtigt wird.

C) Beeinträchtigung der Tiere durch die Folgen der Induktion: Es ist abzuklären, ob die Induktion eines Transgen- oder Knockout-Systems zu Schmerzen, Leiden oder Schäden bei den betroffenen Tieren führen kann. Bei induzierbaren Transgen-Systemen kann hiervon in solchen Fällen ausgegangen werden, in denen das Zielgenprodukt pathogene Eigenschaften hat. Aber es können auch durch die Überexpression eines physiologischen Genprodukts schädigende Effekte verursacht werden. So führt beispielsweise die leberspezifische Überexpression des pro-inflammatorischen Zytokins IFN- γ zu einer Hepatitis (Toyonaga et al., 1994). Andererseits muss die Induktion eines gewebespezifischen Knockout-Defektes nicht zwangsweise eine Belastung der Trägartiere nach sich ziehen.

D) Durchführung weiterer Eingriffe: Wie in Tabelle 1 zusammengefasst unterliegt die Induktion eines Transgen- oder Knockout-Systems für Versuchszwecke durch Gabe eines Induktors immer dann der Anzeige- oder Genehmigungspflicht, wenn durch die Induktion per

²³ EU-Directive 2010/63/EU Art. 1 (2) Satz 3

se oder deren Folgen eine Belastung der Tiere (Schmerzen, Leiden oder Schäden) herbeigeführt werden kann oder wenn weitere belastende Eingriffe durchgeführt werden. Eine Anzeige- oder Genehmigungspflicht entfällt nur in solchen Fällen, in denen weder durch die Induktion selbst, noch durch deren Folgen Belastungen verursacht werden und in denen keine weiteren Eingriffe praktiziert werden.

Die Haltungserlaubnisinhaber nach §11 TierSchG sind verpflichtet, die gesundheitsschädlichen Auswirkungen von Mutationen bei Zucht- und Vorrattieren zu minimieren. Diese Fürsorgepflicht erstreckt sich auch auf induzierbare Transgen- und Knockout-Systeme. So sind Stammkreuzungen zur Kombination der erforderlichen Transgene und Allele eines induzierbaren Systems auf das unabdingbare Maß zu reduzieren, wenn bei den Nachkommen gesundheitliche Belastungen zu befürchten sind. Sofern es bei den Zucht- und Vorrattieren induzierbarer Transgen- und Knockout-Systeme zu systembedingten Belastungen kommen kann, ist eine adäquate Gesundheitsüberwachung zu installieren und es sind eindeutige Kriterien für die vorzeitige Tötung belasteter Tiere zu definieren (Abbruchkriterien). Falls bei induzierbaren Transgen- und Knockout-Systemen der Induktor im Rahmen der Fürsorgeverpflichtung (des Haltungserlaubnisinhabers nach §11 TierSchG) verabreicht wird (z.B. Doxycyclin beim Tet-Off System für das Ausschalten), unterliegt dies keiner Anzeige- oder Genehmigungspflicht, wenn diese (tierärztliche) Behandlung selbst keine Schmerzen erzeugt, die stärker oder ebenso belastend sind, wie eine Injektion mittels Kanülenstich. Eine solch geringe Belastung kann für Applikationen mit dem Trinkwasser oder dem Futter angenommen werden, wenn diese gut akzeptiert und freiwillig aufgenommen werden. Diese (tierärztlichen) Maßnahmen werden überwiegend das Tet-Off-System betreffen, bei dem das Transgen-System durch die Applikation von Doxycyclin im ausgeschalteten Zustand verbleibt. So kann die Expression schädigender Transgenprodukte wie beispielsweise die von Onkogenen in Zucht- oder Vorrattieren inhibiert werden. Es sind jedoch auch Fälle möglich, bei denen durch die Aktivierung eines Tet-On-Systems eine Verbesserung der Gesundheit der Trägartiere erreicht werden kann. Dieser Fall tritt beispielsweise bei Defektmutanten auf, wenn der spezifische Defekt durch die Aktivierung eines Tet-On-Systems kompensiert werden kann. Der Halter solcher gentechnisch veränderten Tiere, welche nur unter entsprechender Medikation schmerz- oder leidensfrei leben können, ist verpflichtet die notwendige Behandlung bedarfsgerecht zu gewähren. Wenn er die Behandlung aus wissenschaftlichen Gründen unterlassen möchte, ist in jedem Falle eine Tierversuchsgenehmigung zu beantragen bzw. dies der zuständigen Behörde anzuzeigen.

Aber auch die Zucht per se ist aufgrund des neuen Tierschutzrechtes ein anzeige- oder genehmigungspflichtiger Tierversuch, wenn die genetisch veränderten Tiere, trotz Behandlung oder lindernder Maßnahmen bzw. weil solche nicht bekannt sind, in ihrem Wohlbefinden beeinträchtigt werden.

Wie bei allen Tierversuchen sind auch bei der Zucht (zielgerichtete Vermehrung von Organismen) der Zweck und andere Konditionen hinsichtlich der Entscheidung ausschlaggebend, ob dieser Tierversuch genehmigungs- oder anzeigepflichtig ist. Genehmigungspflichtig sind Tierversuche, die einen Versuchszweck haben und dessen Ergebnis nicht hinreichend bekannt ist, auch wenn für eine unerlässliche Überprüfung eines hinreichend bekannten Versuchsergebnisses ein Doppel- oder Wiederholungs-Versuch durchgeführt werden soll²⁴. Statt der Genehmigungspflicht besteht aber unter bestimmten Umständen eine Anzeigepflicht, z. B. wenn solche Versuche rechtlich vorgeschrieben sind²⁵. Eine Anzeige (20 Arbeitstage vor Versuchsbeginn, für Arbeitsbeginn siehe Empfangsbestätigung²⁶) genügt u. a. auch dann, wenn der Tierversuch nach erprobtem Verfahren erfolgt und u. a. zur Vermehrung von Organismen dient²⁷.

Wenn allerdings die Belastung aufgrund der genetischen Veränderung oder einer notwendigen Behandlungsmethode als „schwer“ einzustufen ist²⁸, muss für eine solche

²⁴ § 8 Abs. 1, Nr. 1 TierSchG

²⁵ § 8a Abs 1, Nr. 1 TierSchG

²⁶ § 36 TierSchVersV

²⁷ § 8a Abs. 1, Nr. 3 a TierSchG

Zucht in jedem Falle vor Beginn der Verpaarungen eine Genehmigung beantragt werden. Die Verpaarungen dürfen erst nach Erhalt der Genehmigung begonnen werden. Im Fall von erheblichen Schmerzen oder Leiden, die länger anhalten und nicht gelindert werden können, kann die Genehmigung allerdings von der EU Kommission widerrufen werden²⁹.

8b Induzierbare Transgene und die Schweizer Tierschutzregelungen

Die Schweizer Gesetzgebung verlangt eine Belastungserfassung für alle neu erstellten oder neu importierten genveränderten Linien. Aufgrund dieser Belastungserfassung wird entschieden, ob eine Linie unbelastet ist und ohne spezielle Genehmigung weiter gezüchtet werden kann oder nur nach Genehmigung durch die kantonalen Behörden gehalten werden darf (siehe Kapitel 1b). Die Erzeugung von genetisch modifizierten Tieren ist kein jeweils einzeln zu beantragender Tierversuch, sondern darf nach vereinfachter Bewilligung (Antrag mit Formular Form-G) durchgeführt werden. Im Fall einer neu erstellten Linie darf die initiale Charakterisierung, also auch das Töten von Tieren für die Analyse von Organen oder Zellen, ohne eigene Tierversuchsgenehmigung erfolgen. Das Töten von Tieren für die Analyse von Organen oder Zellen ist im Fall von etablierten Linien hingegen genehmigungspflichtig. Die Gabe von Induktoren oder Repressoren einer Transgen-Expression wie beim Tet-System kann nach Rücksprache mit der kantonalen Behörde gegebenenfalls als belastungsmindernde Maßnahme angesehen werden. Die Behörde kann aber auch verlangen, diese Linie mittels Formular Form-M als belastet zu melden. Dann wird ein Entscheid über Zuchtauflagen seitens der Behörden erfolgen. Da sich die Belastung durch einen genetisch bedingten Phänotyp mit derjenigen eines Experiments summiert, muss dies hinsichtlich der Beantragung eines Tierversuchs mit diesem Stamm sowohl bei der prospektiven Belastungseinstufung wie auch bei der Güterabwägung Berücksichtigung finden.

8c Induzierbare Transgene und die österreichischen Tierschutzregelungen

Die Klassifizierung des Schweregrades der prospektiven Belastung genetisch veränderter Tierlinien setzt grundsätzlich eine Einzelfallbewertung voraus, die gegebenenfalls auch die unterschiedlichen konditionalen Allele eines Gens oder die spezifischen Aktivierungsbedingungen eines induzierbaren Systems berücksichtigen muss. Es werden also auch Linien mit konditional induzierbaren Mutationen phänotypisch beurteilt, deren genetische Veränderung allein noch keinen Einfluss auf den Phänotyp erwarten lässt. Beruht die konditionale Eigenschaft eines transgenen Locus auf dem Einsatz von Rekombinasen bzw. Integrasen, erfordert dies i.d.R. die Zucht einer Doppelmutante, sodass eine neu zu beurteilende Linie entsteht. Beinhaltet die Aktivierung der konditionalen Mutation die Verabreichung von Induktoren durch eine Methode, die Schmerzen, Leiden, Ängste oder dauerhafte Schäden verursachen kann, besteht dafür generell Genehmigungspflicht im Rahmen eines eigenen Forschungsprojektes. Die enterale Zufuhr von spezifischen Arzneimitteln als Aktivator oder Repressor über das Trinkwasser oder das Futter unterliegt keiner Genehmigungspflicht, wenn die Nahrungsaufnahme dadurch nicht beeinträchtigt wird und durch die Verabreichung dieser Substanzen keine Nebenwirkungen bei den Tieren zu erwarten sind. In allen anderen Fällen ist der Einfluss auf das Wohlbefinden der Tiere bzw. der mögliche Grad der Belastung in Abhängigkeit von den Umständen des konkreten Einzelfalls (Versuchsdesigns) zu beurteilen. So kann z.B. entschieden werden, auf die Bewertung einer neuen Mutante mit gewebespezifischer Inaktivierung zu verzichten, wenn der konstitutive Knockout dieses Gens bereits umfassend phänotypisch charakterisiert ist und dabei keine Belastung für das Tier festgestellt wurde.

²⁸ § 8a Abs. 2, Nr.2 TierSchG

²⁹ § 26 Abs. 1 TierSchVersV

System	Erklärung	Beeinträchtigung ohne Induktion	Genehmigungs- oder Anzeigepflicht ohne Induktion	Beeinträchtigung durch die Induktion per se	Genehmigungs- oder Anzeigepflicht bei Induktion
Tet-Off	Applikation von Doxycyclin schaltet Genexpression ab.	Abhängig vom Transgen	abhängig vom Transgen	Trinkwasser: Nein bei Akzeptanz*	Bei unbelastendem Transgenphänotyp unter der Behandlung: Nein* Bei belastendem Transgenphänotyp unter der Behandlung: Ja
Tet-On	Applikation von Doxycyclin aktiviert Genexpression.	Nein	Nein	Trinkwasser: Nein bei Akzeptanz	Nein/bei belastendem Transgenphänotyp: Ja
LightOn	Induktion von Genexpression durch blaues Licht.	Nein	Nein	Licht: Nein, abhängig vom Versuch	Nein/ bei belastendem Transgenphänotyp: Ja
MX-Cre	Induktion der Transkription der Cre-Rekombinase durch Typ 1 Interferon oder poly-I/poly-C.	Nein	Nein	i.p. Injektion: Ja	Ja
HSP70 Promoter	Induktion durch Hitze, z.B. durch MRI-fokussierten Ultraschall.	Nein	Nein	Hitze: Ja	Ja
CreER ^{T2}	Induktion der Cre-Aktivität durch Bindung von Tamoxifen.	Nein	Nein	Futter: Nein bei Akzeptanz Gavage/Injektion: Ja	Futter: Nein Gavage/Injektion: Ja Bei belastendem Transgenphänotyp: Ja
floxed STOPP-Kassette	Herausschneiden einer STOPP-Kassette durch eine Rekombinase (Cre, Dre etc.).	Nein	Nein	-	Bei belastendem Transgenphänotyp: Ja
Inversion	Inversion eines loxP-flankierten Gensegmentes.	Nein	Nein	-	Bei belastendem Transgen/Ablations-Phänotyp: Ja
loxP, rox-Flankierung	Herausschneiden eines Gensegmentes.	Nein	Nein	-	Bei belastendem Ablations-Phänotyp: Ja
Diphtherietoxin Rezeptor	Zellablation durch Injektion von Diphtherietoxin	Nein	Nein	i.p. Injektion: Ja	Ja
Channelrhodopsin	Licht-induzierter Kationenkanal.	Nein	Nein	Licht allein: Nein Bei Fixierung/Narkose: Ja Bei Phototoxizität: Ja	Bei belastendem induzierten Phänotyp: Ja
Halorhodopsin	Licht-induzierter Chlorid-Kanal.	Nein	Nein	Licht allein: Nein Bei Fixierung/Narkose: Ja Bei Phototoxizität: Ja	Bei belastendem induzierten Phänotyp: Ja
Thymidinkinase	Zellablation durch Gabe von Ganciclovir.	Nein, bisweilen männliche Sterilität.	Nein	Trinkwasser: Nein bei Akzeptanz i.p. Injektion: Ja	Trinkwasser: Nein bei Akzeptanz i. p. Injektion: Ja Bei belastendem Transgenphänotyp: Ja

Tabelle 1: Tierschutzrechtliche Einordnung verschiedener induzierbarer Transgensysteme, *Doxycyclin kann möglicherweise im Rahmen der Fürsorgepflicht des §11 Halters bzw. als Zuchtmaßnahme (CH) gegeben werden.

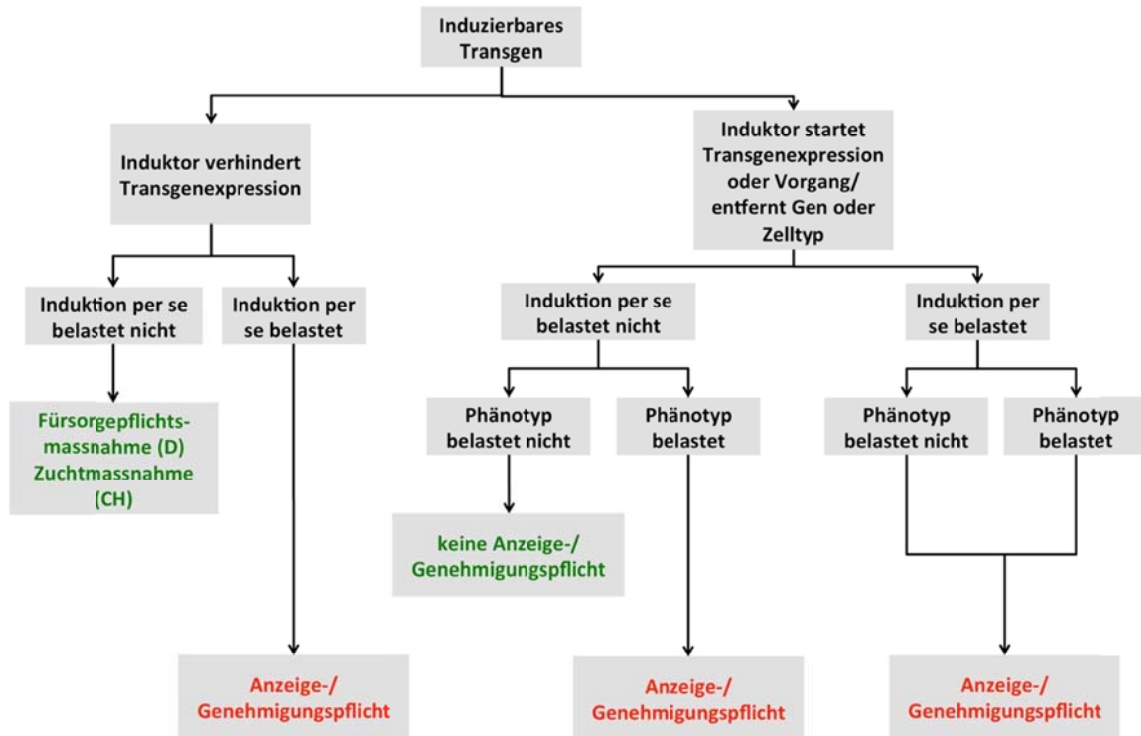


Fig. 2: Flussdiagramm als Entscheidungshilfe zur rechtlichen Einordnung von induzierbaren Mutanten, ausgehend davon, dass eine Erlaubnis zur Zucht und Haltung (§11-TierSchG) von (genveränderten) Versuchstieren vorliegt.

9 Literatur

- Anastassiadis, K., J. Fu, C. Patsch, S. Hu, S. Weidlich, K. Duerschke, F. Buchholz, F. Edenhofer and A. F. Stewart (2009). "Dre recombinase, like Cre, is a highly efficient site-specific recombinase in E. coli, mammalian cells and mice." *Dis Model Mech* 2(9-10): 508-515.
- Boyden, E. S., F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel and K. Deisseroth (2005). "Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity." *Nat Neurosci* 8(9): 1263-1268.
- Brockschneider, D., Y. Pechmann, E. Sonnenberg-Riethmacher and D. Riethmacher (2006). "An improved mouse line for Cre-induced cell ablation due to diphtheria toxin A, expressed from the Rosa26 locus." *Genesis* 44(7): 322-327.
- Bush, T. G., T. C. Savidge, T. C. Freeman, H. J. Cox, E. A. Campbell, L. Mucke, M. H. Johnson and M. V. Sofroniew (1998). "Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice." *Cell* 93(2): 189-201.
- Cramer M, Iglauer F, Reifenberg K, Rütter U, Bottermann H, Crowell K, Müller P Wille M (1996) Die Erzeugung und Zucht transgener Mäuse und Ratten unter Tierschutzgesichtspunkten, Informationspapier des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (BML) vom 15.04.1996, publiziert im Anhang 4 des Tierschutzberichtes 1997
- Feil, R., J. Brocard, B. Mascres, M. Lemeur, D. Metzger and P. Chambon (1996). "Ligand-activated site-specific recombination in mice." *Proc. Acad. Sci. USA* 93: 10887-10890.
- Golic, K. G. and S. Lindquist (1989). "The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome." *Cell* 59(3): 499-509.
- Gossen, M. and H. Bujard (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(12): 5547-5551.
- Gossen, M., S. Freundlieb, G. Bender, G. Muller, W. Hillen and H. Bujard (1995). "Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells." *Science* 268(5218): 1766-1769.
- Han, X. and E. S. Boyden (2007). "Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution." *PLoS One* 2(3): e299.
- Indra, A. K., X. Warot, J. Brocard, J. M. Bornert, J. H. Xiao, P. Chambon and D. Metzger (1999). "Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases." *Nucleic Acids Res* 27(22): 4324-4327.
- Ivanova, A., M. Signore, N. Caro, N. D. Greene, A. J. Copp and J. P. Martinez-Barbera (2005). "In vivo genetic ablation by Cre-mediated expression of diphtheria toxin fragment A." *Genesis* 43(3): 129-135.
- Kraus, M., L. I. Pao, A. Reichlin, Y. Hu, B. Canono, J. C. Cambier, M. C. Nussenzweig and K. Rajewsky (2001). "Interference with immunoglobulin (Ig)alpha immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) phosphorylation modulates or blocks B cell development, depending on the availability of an Igbeta cytoplasmic tail." *J Exp Med* 194(4): 455-469.
- Kühn, R., F. Schwenk, M. Aguet and K. Rajewsky (1995). "Inducible gene targeting in mice." *Science* 269(5229): 1427-1429.
- Liu, F., Y. Song and D. Liu (1999). "Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA." *Gene Ther* 6(7): 1258-1266.
- McGrane, M. M., J. de Vente, J. Yun, J. Bloom, E. Park, A. Wynshaw-Boris, T. Wagner, F. M. Rottman and R. W. Hanson (1988). "Tissue-specific expression and dietary regulation of a chimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase/bovine growth hormone gene in transgenic mice." *J Biol Chem* 263(23): 11443-11451.
- Saam, J. R. and J. I. Gordon (1999). "Inducible gene knockouts in the small intestinal and colonic epithelium." *J Biol Chem* 274(53): 38071-38082.
- Saito, M., T. Iwawaki, C. Taya, H. Yonekawa, M. Noda, Y. Inui, E. Mekada, Y. Kimata, A. Tsuru and K. Kohno (2001). "Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice." *Nat Biotechnol* 19(8): 746-750.
- Sauer, B. and N. Henderson (1989). "Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome." *Nucleic Acids Res* 17(1): 147-161.
- Smith, F., D. Jacoby and X. O. Breakefield (1995). "Virus vectors for gene delivery to the nervous system." *Restor Neurol Neurosci* 8(1): 21-34.
- Smith, R. C., M. Machluf, P. Bromley, A. Atala and K. Walsh (2002). "Spatial and temporal control of transgene expression through ultrasound-mediated induction of the heat shock protein 70B promoter in vivo." *Hum Gene Ther* 13(6): 697-706.

GV-SOLAS, Ausschuss für Genetik und Labortierzucht, Tierschutzrechtliche Einordnung induzierbarer Transgen- und Knockout-Systeme, 3. September 2018

Szymczak, A. L., C. J. Workman, Y. Wang, K. M. Vignali, S. Dilioglou, E. F. Vanin and D. A. Vignali (2004). "Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector." *Nat Biotechnol* 22(5): 589-594.

Wang, X., X. Chen and Y. Yang (2012). "Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system." *Nat Methods* 9(3): 266-269.

Wickersham, I. R., S. Finke, K. K. Conzelmann and E. M. Callaway (2007). "Retrograde neuronal tracing with a deletion-mutant rabies virus." *Nat Methods* 4(1): 47-49.